

# 일반생물학실험2 레포트 4

## 실험 10. 개체군의 성장

- Growth Curve of Bacterial Population

## I. Abstract

본 실험에서는 E.Coli의 개체군 성장을 정량적으로 분석하기 위해 시간에 따른 흡광도를 측정하고 이를 세포수로 환산하여 E.Coli의 성장곡선을 작성하였다. 배양 초기부터 2.75h까지 0.25h 간격으로 흡광도를 측정한 결과, 0~1.75h 구간에서 세포수가 지수적으로 증가하는 log phase가 관찰되었고 이후 증가 속도가 둔화되는 stationary phase에 도달하는 것을 관찰하였다.

흡광도 기반 정량 방법은 살아있는 세포 뿐 아니라 죽은 세포에 대한 산란도 포함하기 때문에 log phase에서의 선형회귀를 이용해 죽은 세포를 추정하여 죽은 세포로 인한 오차를 보정하였다. 보정 결과 전체 곡선 형태는 크게 달라지지 않았지만 초기 구간에는 죽은 세포가 O.D 측정치에 영향을 주는 것으로 나타났다. 세대시간(g)은 서로 다른  $\Delta t$  구간에서 계산한 결과 0.41~0.53 h로 분포했으며, 긴 구간(0~1.75 h)을 사용했을 때 가장 안정적인 값인 0.43 h/세대가 도출되었다. 본 실험을 통해 O.D 측정의 특성과 한계, 미생물 성장의 lag, log, stationary phase의 특성, 그리고 환경 수용력에 의해 개체군이 성장이 제한되는 것을 확인할 수 있었다.

## II. Introduction

*Escherichia coli*는 배양이 용이하고 세대시간이 짧아 미생물 생리 연구와 분자생물학 실험에서 대표적인 모델 생물로 널리 사용된다. 미생물 개체군은 배양 환경에 따라 일정한 성장 패턴을 보이며, 일반적으로 lag phase, exponential phase(log phase), stationary phase, 그리고 death phase로 구분되는 성장곡선을 나타낸다. 이 중 log phase에서는 세포가 일정한 세대시간을 유지하며 지수적으로 증식하므로, 성장률과 세대시간은 세포의 생리적 상태를 정량적으로 반영하는 중요한 지표가 된다(Monod, 1949).

미생물의 성장 곡선은 이론적으로는 지수적(J-shaped) 증가를 가정할 수 있으나, 실제 배양 환경에서는 영양분 고갈, 산소 제한, 대사산물 축적과 같은 환경 저항이 작용하여 S형(logistic) 성장곡선의 형태를 보이는 경우가 많다. 따라서 배양 조건과 측정 방법을 고려한 정량적 분석이 필수적이며, 특히 log phase 구간의 정확한 설정과 세대시간 계산은 성장 곡선 해석의 핵심 요소가 된다.

미생물 농도를 정량하는 방법에는 직접 계수법, 생화학적·화학적 분석법, 그리고 물리적 분석법이 있으며, 이 중 흡광도(optical density)를 이용한 물리적 방법은 비파괴적이고 신속하다는 장점으로 인해 가장 널리 사용된다. 특히 600 nm 파장에서 측정한 흡광도( $OD_{600}$ )는 세포에 의한 빛의 산란 정도를 반영하여 세포 밀도를 간접적으로 추정할 수 있다. 다만 흡광도 기반 측정은 살아있는 세포와 죽은 세포를 구분하지 못하고, 세포 농도가 증가할수록 비선형성이 나타날 수 있으며, blank 설정이나 cuvette 상태에 따른 오차에 민감하다는 한계가 존재한다(Monod, 1949; Stevenson et al., 2016).

또한 lag phase의 길이는 접종된 세포의 생리적 상태와 이전 배양 조건에 크게 의존한다. 정지기나 사멸기에 도달한 세포를 새로운 배지에 접종할 경우, 세포는 단백질과 효소의 재합성, 에너지 대사 회복 등의 과정을 거쳐야 하므로 뚜렷한 lag phase가 관찰되는 반면, 이전과 유사한 배지 조건에서 배양된 세포를 접종하는 경우에는 lag phase가 매우 짧거나 관찰되지 않을 수 있다(Pinto et al., 2011).

본 실험의 목적은 E. coli를 액체 LB 배지에서 배양하며 시간에 따른 흡광도 변화를 측정하고, 이를 바탕으로 성장곡선을 작성하여 각 성장 단계의 특징을 분석하는 데 있다. 특히 log phase

구간에서 세대시간을 계산하고, 실험적으로 얻은 성장 패턴이 미생물 성장 이론과 어떻게 일치하는지를 검토하고자 하였다. 이를 통해 흡광도 기반 성장 분석의 유용성과 한계를 이해하고, 배양 조건과 측정 오차가 성장 곡선 해석에 미치는 영향을 종합적으로 고찰하고자 한다.

### III. Materials and Methods

본 실험에서 사용한 재료는 다음과 같다. 밤새 LB 5 mL에서 배양한 *E. coli* 배양액, LB broth 50 mL, 125 mL 삼각 플라스크, 그리고 삼각 플라스크는 호기성 세균 배양에 적합한 실리스토퍼를 사용하여 막아주었다. 흡광도 측정을 위해 spectrophotometer와 cuvette을 사용하였으며, 멸균 작업을 위하여 알코올 램프, 1000  $\mu$ L 및 200  $\mu$ L 피펫과 팁, microcentrifuge tube를 사용하였다. 배양 과정에서는 배양액을 공기와 충분히 접촉시키기 위해 37°C shaking incubator를 사용하였다.

모든 과정은 화염 멸균을 위하여 알코올 램프를 켜 채 진행하였다. 먼저 LB broth를 blank로 설정한 후, 초기 배양액을 cuvette에 넣어 600 nm에서 초기 흡광도를 측정하였다. 이후 배양액이 담긴 삼각 플라스크를 37°C shaking incubator에 배치하고, 0~2.75 h 동안 15분 간격으로 흡광도를 측정하였다. 측정 과정에서 OD 값이 0.6을 초과하면 정확도를 유지하기 위해 배양액을 LB로 1/5 희석하여 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 다음의 관계식을 이용하여 세포수로 변환하였다.

$$\text{Cell Number} = \text{흡광도} \times 10^9 \text{ (cells/mL)}$$

각 시간대의 세포수는 1조와 2조의 측정값으로부터 평균과 표준편차를 산출하였으며,  $\log_{10}$  변환된 세포수 값을 이용하여 성장곡선을 작성하였다.

### IV. Results

이번 실험에서는 배양 시간에 따른 E.Coli의 세포수의 변화를 물리적 정량 방법 중 하나인 흡광도를 활용하여 확인하였다. 0.25h를 주기로 흡광도를 반복 측정하고 이를 이용하여 세포수를 계산하였다. (Table 1, Table 2(a)) 세포수의 로그값을 이용해 성장 곡선에 사용하였다. 성장 곡선은 1~0.75h 구간을 exponential phase로 설정하였다.

Table 1. 배양 시간별 1조·2조 흡광도 및 평균·표준편차

| Time (h) | 1 조 흡광도(OD <sub>600</sub> ) | 2 조 흡광도(OD <sub>600</sub> ) | 평균 흡광도(OD <sub>600</sub> ) | 표준편차     |
|----------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------|
| 0        | 0.037                       | 0.034                       | 0.0355                     | 0.002121 |
| 0.25     | 0.054                       | 0.048                       | 0.051                      | 0.004243 |
| 0.5      | 0.083                       | 0.072                       | 0.0775                     | 0.007778 |
| 0.75     | 0.12                        | 0.106                       | 0.113                      | 0.009899 |
| 1        | 0.191                       | 0.163                       | 0.177                      | 0.019799 |
| 1.25     | 0.303                       | 0.256                       | 0.2795                     | 0.033234 |
| 1.5      | 0.425                       | 0.349                       | 0.387                      | 0.05374  |
| 1.75     | 0.605                       | 0.565                       | 0.585                      | 0.028284 |

|      |       |       |        |          |
|------|-------|-------|--------|----------|
| 2    | 0.88  | 0.785 | 0.8325 | 0.067175 |
| 2.25 | 1.18  | 1.005 | 1.0925 | 0.123744 |
| 2.5  | 1.39  | 1.255 | 1.3225 | 0.095459 |
| 2.75 | 1.465 | 1.495 | 1.48   | 0.021213 |

각 시간대별 흡광도는 두 조에서 반복 측정되었으며, 이를 바탕으로 평균과 표준편차를 계산하였다. 표준편차는 다음 식을 사용하였다.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

여기서  $x_i$ 는 각 조의 측정값,  $\bar{x}$ 는 평균값,  $n$ 은 표본 수(=2)이다.

Table 2 (a). 흡광도 기반 세포수 변환표

| Time (h) | 평균 흡광도(OD <sub>600</sub> ) | 1 조 cell 수 | 2 조 cell 수 | 평균 cell 수  | 표준편차     |
|----------|----------------------------|------------|------------|------------|----------|
| 0        | 0.0355                     | 37000000   | 34000000   | 35500000   | 2121320  |
| 0.25     | 0.051                      | 54000000   | 48000000   | 51000000   | 4242641  |
| 0.5      | 0.0775                     | 83000000   | 72000000   | 77500000   | 7778175  |
| 0.75     | 0.113                      | 120000000  | 106000000  | 113000000  | 9899495  |
| 1        | 0.177                      | 191000000  | 163000000  | 177000000  | 19798990 |
| 1.25     | 0.2795                     | 303000000  | 256000000  | 279500000  | 33234019 |
| 1.5      | 0.387                      | 425000000  | 349000000  | 387000000  | 53740115 |
| 1.75     | 0.585                      | 605000000  | 565000000  | 585000000  | 28284271 |
| 2        | 0.8325                     | 880000000  | 785000000  | 832500000  | 67175144 |
| 2.25     | 1.0925                     | 1180000000 | 1005000000 | 1092500000 | 1.24E+08 |
| 2.5      | 1.3225                     | 1390000000 | 1255000000 | 1322500000 | 95459415 |
| 2.75     | 1.48                       | 1470000000 | 1495000000 | 1480000000 | 21213203 |

Table 2 (b). 흡광도 기반 세포수 변환표

| Time (h) | log(1 조 Cell 수) | log(2 조 Cell 수) | log(평균 Cell 수) |
|----------|-----------------|-----------------|----------------|
| 0        | 7.568202        | 7.531479        | 7.550228       |
| 0.25     | 7.732394        | 7.681241        | 7.70757        |
| 0.5      | 7.919078        | 7.857332        | 7.889302       |
| 0.75     | 8.079181        | 8.025306        | 8.053078       |
| 1        | 8.281033        | 8.212188        | 8.247973       |
| 1.25     | 8.481443        | 8.40824         | 8.446382       |
| 1.5      | 8.628389        | 8.542825        | 8.587711       |
| 1.75     | 8.781755        | 8.752048        | 8.767156       |

|      |          |          |          |
|------|----------|----------|----------|
| 2    | 8.944483 | 8.89487  | 8.920384 |
| 2.25 | 9.071882 | 9.002166 | 9.038421 |
| 2.5  | 9.143015 | 9.098644 | 9.121396 |
| 2.75 | 9.165838 | 9.174641 | 9.170262 |

각 시간대별 흡광도는 두 조에서 반복 측정되었으며, 이를 바탕으로 평균과 표준편차를 산출하였다. 세포수(cell number)는 다음 변환식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Cell Number} = \text{흡광도} \times 10^9 \text{ (cells/mL)}$$

표준편차는 아래 식을 사용하여 구하였다.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

여기서  $x_i$ 는 각 조의 측정값,  $\bar{x}$ 는 평균값,  $n = 2$ 이다.

표 2(b)는 표 2(a)에서 산출된 세포수 값을 성장 경향 분석을 위해  $\log_{10}$  변환한 결과를 제시하였다. 로그 변환은 세포수 증가의 지수적 특성을 선형적으로 비교하기 위하여 적용되었으며, 각 시간대별로 1조·2조 세포수와 그 평균값에 대해  $\log_{10}$  값을 계산하였다.

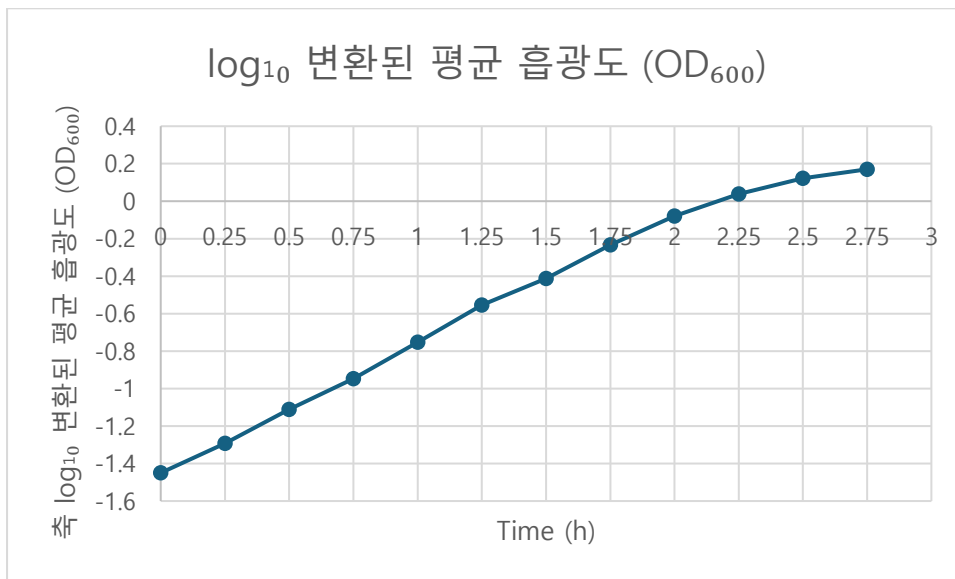


Figure 1. 세포 성장에 따른 평균 흡광도 변화(Log Y-Axis)

각 시간대별 흡광도는 1조와 2조에서 반복 측정하였으며, 두 값의 평균값을 그래프에 사용하였다. 흡광도 데이터는 지수적 증가 양상을 보이므로, 변화 추세를 명확하게 시각화하기 위해 Y축은 로그 스케일( $\log_{10}$ )로 설정하였다. 모든 그래프는 평균 흡광도를 시간에 대해 도식화하여 작성하였다.

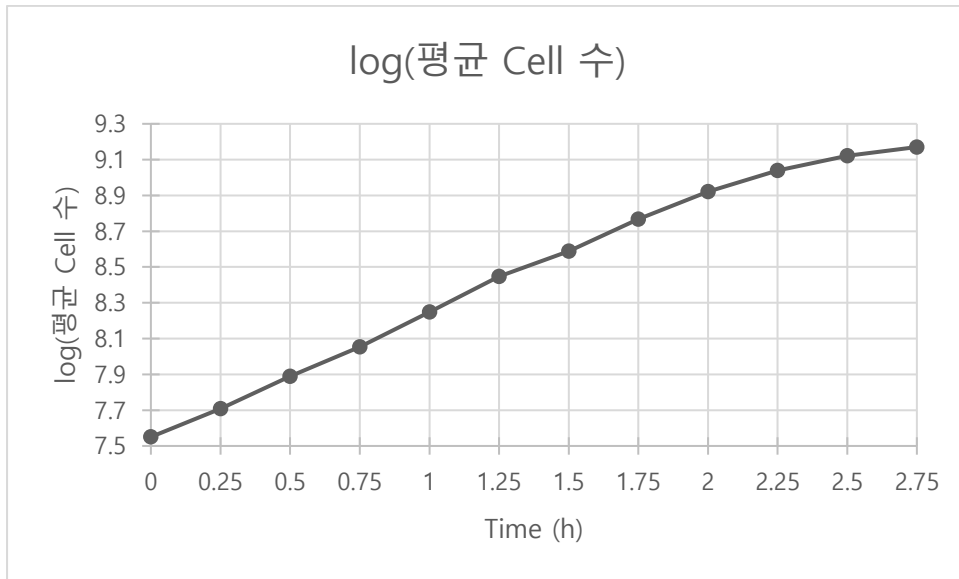


Figure 2 (a). 시간에 따른 평균 세포수의 로그 변환값 변화

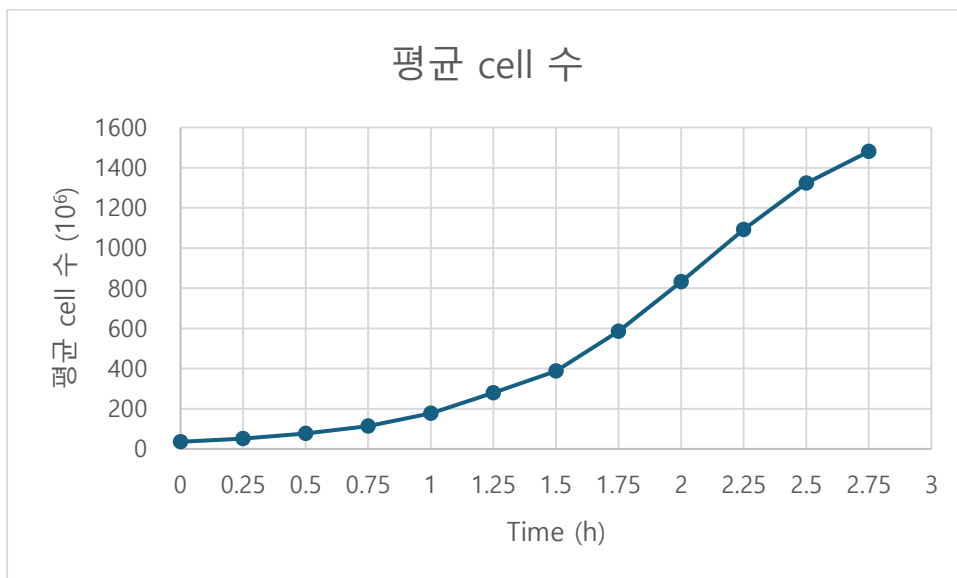


Figure 2 (b). E.Coli의 성장곡선

Figure 2 (a)는 각 시간대별 평균 세포수를  $\log_{10}$ 으로 변환하여 나타낸 성장곡선이다.  $\log(\text{평균 세포수})$ 는 0~1.75 h 구간에서 시간에 대해 직선적으로 증가하여 지수성장기(exponential phase)를 형성한다. Figure 2(b).  $\log$  변환하지 않은 평균 세포수의 증가를 나타낸 그래프로, E.Coli의 성장곡선이다. lag phase가 관찰되지 않고 0h ~ 1.75h 동안은 시간에 따라 세포수가 지수적으로 증가하는 log phase가, 1.75h ~ 2.75h 동안은 stationary phase가 관찰된다.

log phase 구간 내에서 서로 다른 시간 간격을 갖는 세 쌍의 점을 선택하여 초기 세포수 ( $N_0$ )와 최종 세포수 ( $N$ )으로 사용하였다.  $N_{a0}$ ,  $N_a$ 는 각각 0.25h과 0.50 h으로,  $N_{b0}$ ,  $N_b$ 는 각각 1.25h, 1.50 h,  $N_{c0}$ ,  $N_c$ 는 각각 0h, 1.75 h으로 임의의 점을 잡았다. 이후 각각의 쌍들에 대해 다음의 관계식을 통해 세대수  $n$ , 지수성장에 소요된 시간  $t$ , 세대시간(doubling time)  $g$ 을 계산하였다.

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} \approx \frac{\log N - \log N_0}{0.301}$$

$$t = t_N - t_{N_0}$$

$$g = \frac{t}{n}$$

$N_{a0}$ - $N_a$ (0.25-0.50 h)에 대해서는  $\log N_0 = 7.70757$ ,  $\log N = 7.889302$ 이니  $n = 0.60$ 세대,  $t = 0.25$ h,  $g = 0.41$ h/세대이다.  $N_{b0}$ - $N_b$ (1.25-1.50 h)에 대해서는  $\log N_0 = 8.446382$ ,  $\log N = 8.587711$ 에서  $n = 0.47$ 세대,  $t = 0.25$ h,  $g = 0.53$ h/세대로,  $N_{c0}$ - $N_c$ (0-1.75 h)에 대해서는  $\log N_0 = 7.550228$ ,  $\log N = 8.767156$ 에서  $n = 4.04$ 세대,  $t = 1.75$ h,  $g = 0.43$ h/세대로 산출되었다.

Figure 2 (b)는 *E. coli*의 성장 곡선이다. 세포수는 시간에 따라 지수적으로 증가하는 양상을 보이며, 특히 1.5 h 이후 증가 속도가 급격히 커져 전체적으로 J형 성장 패턴을 형성한다. 눈에 띄는 lag phase가 나타나지 않고, 배양 시작 직후부터 세포수가 지속적으로 증가하는 것으로 관찰된다.

## V. Discussion

이번 실험은 증식 속도가 빠르고 배양이 용이한 *E. coli*를 이용하여 미생물의 개체군의 성장을 정량적으로 측정하였다. 이를 위해 *E. coli* 배양액의 흡광도를 시간에 따라 측정하고, 흡광도를 세포수로 환산하여 성장곡선을 도출하였다.

미생물 성장 곡선을 분석한 결과 경과 시간이 0~1.75 h일 때는 명확한 exponential phase(log phase)로 분류할 수 있고 1.75~2.75 h에서는 증가율이 둔화되어 stationary phase로 분류할 수 있다. 이러한 양상의 성장 곡선은 이론적인 J형 곡선이 아니라 자원이 제한된 실제 환경에서 흔히 관찰되는 환경 저항을 가정한 S형(logistic) 성장곡선으로 볼 수 있다. shaking incubator를 사용해 shaking하여 공기와 더 많이 접촉하도록 하여 호기성 세균인 *E. coli*가 생장하기 유리한 환경을 조성하였음에도 플라스크라는 제한된 공간과 제한된 양의 배지 안의 영양분, 부족한 산소 공급으로 인해 개체군 크기는 결국 환경 수용력에 수렴하게 된다.

이러한 환경 수용력은 결국 균주의 특성 즉, strain과 본 실험에서 사용한 LB 배지의 영양 조성에 의해 결정되며, stationary phase에서의 최대 cell number는 환경 수용력에 수렴하게 된다. 추가적으로, 본 실험에서 streaking을 통해 얻은 단일 콜로니를 배양하여 사용하였기에 초기 집단은 유전적으로 거의 동일하다. 즉, 대사 능력과 성장 속도가 균일하므로, 동일한 배양 조건에서는 stationary phase에서 도달하는 최대 세포수가 거의 일정하게 나타나기에 초기 접종량(seeding)이 50이든 100이든, 환경이 허용하는 최대 개체수는 본질적으로 변하지 않는다.

이처럼 개체군의 환경 수용력을 확인하기 위해서는 시간에 따른 세포의 수, 즉 세포 밀도를 정확하게 정량하는 측정 기법이 필요하다. 본 실험에서는 물리적 정량 방법 중 하나인 흡광도를 사용하였다. 다만, 흡광도는 absorbance와 optical density로 나뉘고 absorbance는 특정 파장에서의 빛의 흡수만 측정하지만 optical density는 빛의 흡수와 세포에 의해 발생할 수 있는 빛의

산란까지 포함하여 시료의 탁한 정도를 측정한다. 이번 실험의 시료는 색이 거의 없는 세포로, 흡수보다 산란에 의해 빛의 경로가 크게 변화한다. 그러므로 미생물의 농도를 추정할 때에는 absorbance보다 optical density(이하 O.D)가 더 적절하다.

그러나 O.D는 저농도에서는 세포수에 비례하지만, 일정 농도 이상에서는 증가율이 점차 감소한다. 이는 산란에 의해 발생한다. 즉, O.D는 세포농도가 높아짐에 따라 Beer-Lambert법칙이 성립하지 않는다. (Stevenson et al., 2016) 이러한 이유로 이번 실험에서는 일반적으로 널리 사용되는 기준인 O.D이 0.6을 초과하면 시료를 희석하여 흡광도를 다시 측정한 후 얻은 값을 희석 배수를 곱해주어 실제 O.D를 계산하였다.

또한 O.D는 살아있는 세포뿐 아니라 죽은 세포가 산란한 빛을 인식하는 특징이 있다. 이는 죽은 세포가 포함된 시료의 경우 O.D 기반의 세포 수 추정값은 실제 살아있는 세포수보다 높게 나타나게 할 수 있다. 특히 초기 시기의 경우 비교적 O.D가 낮아 전체 세포수 중 죽은 세포의 비율이 크므로 죽은 세포로 인한 영향이 상대적으로 더 크게 나타날 수 있다. 따라서 이러한 편향을 최소화하기 위해 죽은 세포의 수를 추정한 후, 죽은 세포로 인한 오차를 제거한 성장 곡선을 다시 작성하였다.

E.Coli는 세대시간이 지나면 분열하여 두 배가 된다. 그렇기에 살아있는 E.Coli는 log phase에서 다음 식과 같이 분열한다.

$$N(t) = N_0 \cdot 2^{t/g}$$

( $N(t)$ : t시간 뒤 세포수,  $N_0$ : 초기 세포수,  $g$ : 세대시간)

$\log N(t)$ 의 값은  $y=a+bt$  형태의 식으로 나타낼 수 있다.

$$\log N(t) = \log N_0 + \frac{t}{g} \log 2$$

이 식은 증가하는 세포의 수 즉, 살아있는 세포의 증가만 반영한다. 그러므로 이 식을 통하여 살아있는 세포의 세포수만을 구할 수 있다.

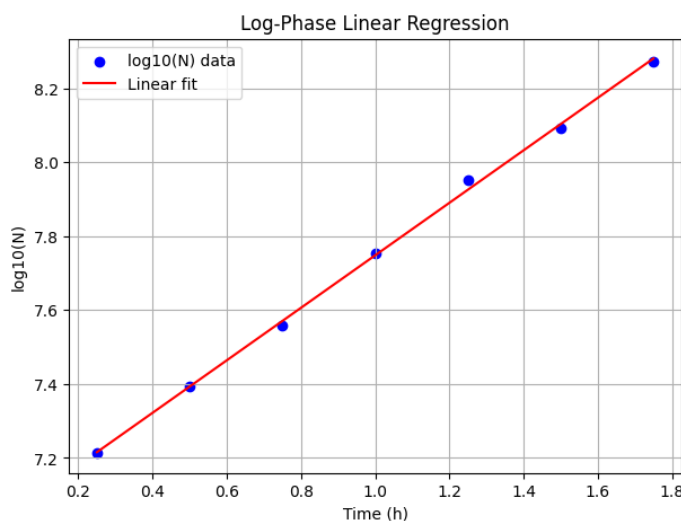


Figure 3. Log-phase 구간에서의  $\log_{10}(N)$ -시간 직선 회귀 분석



Figure 3는 log phase구간의 데이터에 대해 python을 통하여 선형회귀를 수행한 그래프이다. 그래프의 기울기와 절편을 이용해  $t = 0$  h에서의 살아있는 세포수를 추정할 수 있다. 선형 회귀식은 다음과 같다.

$$\log_{10} N(t) = 7.533 + 0.7098t$$

이 회귀식의 절편(7.533)은  $t = 0$  h에서의 살아있는 세포수의 로그값을 의미한다. 따라서 초기 살아있는 세포수는 약  $3.41 \times 10^7$  cells/mL이다. 오차를 제외하지 않은 초기 세포수는 약  $3.55 \times 10^7$  cells/mL였으므로, 이 죽은 세포수는 이 두 값의 차인 약  $1.39 \times 10^6$  cells/mL로 추정된다. O.D 값으로 변환하면 약 0.0014에 해당한다.

Table 3. Log-phase 동안 전체 세포수 대비 죽은 세포의 상대적 비중

| Time (h) | 평균 cell 수 | 죽은 세포 비중(%) |
|----------|-----------|-------------|
| 0        | 35500000  | 3.92%       |
| 0.25     | 51000000  | 2.73%       |
| 0.5      | 77500000  | 1.79%       |
| 0.75     | 113000000 | 1.23%       |
| 1        | 177000000 | 0.79%       |
| 1.25     | 280000000 | 0.50%       |
| 1.5      | 387000000 | 0.36%       |
| 1.75     | 585000000 | 0.24%       |

본 표는 회귀식으로 추정된 초기 살아있는 세포수( $3.41 \times 10^7$  cells/mL)와 초기 전체 세포수( $3.55 \times 10^7$  cells/mL)의 차이를 기반으로 산출한 죽은 세포수( $\approx 1.39 \times 10^6$  cells/mL)를 이용하여, 0–1.75 h 동안 전체 세포수 대비 죽은 세포가 차지하는 비율을 계산한 결과이다. 시간이 지남에 따라 전체 세포수는 증가하지만 죽은 세포수는 일정하므로, 상대적 비중은 지속적으로 감소한다.

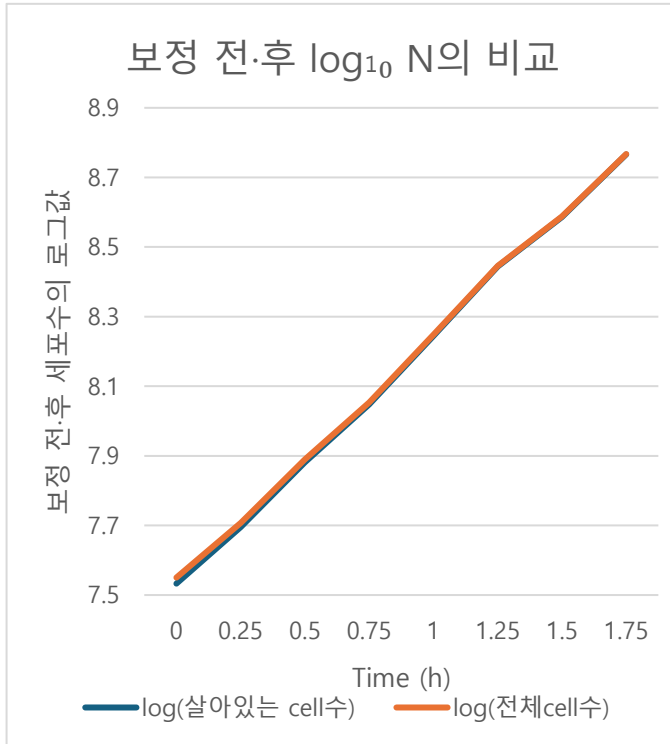


Figure 4 (a). 보정 전·후 세포수의 로그값 비교

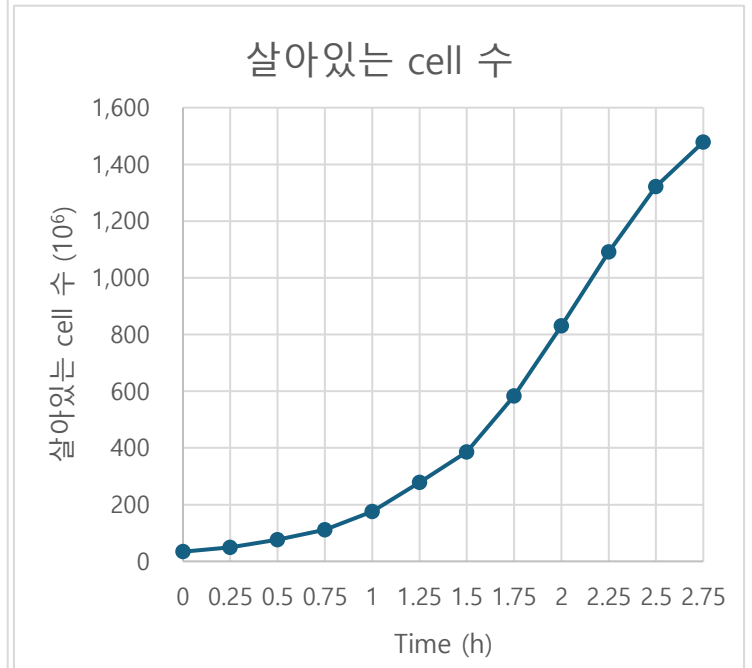


Figure 4 (b). 보정 후 성장 곡선

Figure 4(a)는 죽은 세포를 제거하기 전과 후의 세포수의 로그값 그래프이다. 그래프는 전체적으로 유사한 추세를 보이지만 초기 구간에서 차이가 있다. 이는 죽은 세포가 양이 적어 세포수에 큰 영향을 미치지 않았다는 것을 보여준다. Figure 4 (b)는 죽은 세포를 제외한 살아있는 세포의 세포수로 그린 성장곡선이다. 이는 죽은 세포가 있는 세포의 성장곡선인 figure 2 (b)과 비교했을 때 유의미한 차이를 보이지 않았다. lag phase가 관찰되지 않고 0h ~ 1.75h 동안은 시간에 따라 세포수가 지수적으로 증가하는 log phase가, 1.75h ~ 2.75h 동안은 stationary phase가 관찰된다.

figure 4 (a) 에서 차이가 조금이나마 존재했던 초기 단계의 경우, 죽은 세포가 전체 세포수에서 차지하는 비율은 약 4%를 차지하고 이를 통해 초기 단계에서 죽은 세포가 O.D측정에 상대적으로 더 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 이러한 측면에서 죽은 세포를 제거하여 보정한 성장곡선을 작성하는 과정은 초기 단계의 세포 수 추정의 정확도를 높인다는 점에서 의의가 있다.

성장 곡선의 초기 단계의 오차에 기여하는 죽은 세포를 제거한 후에도 성장곡선에서 lag phase를 관찰할 수 없었다. 일반적으로 stationary phase나 death phase에 도달한 세포를 새로운 배지를 옮기는 경우에는 뚜렷한 lag phase가 나타난다. stationary phase의 세포는 영양고갈, 제한된 산소 등의 스트레스를 받은 상태로 리보솜 감소, 대사 효소 발현 저하 등이 누적되어 있다. 새로운 배지에서 성장하기 위해서는 단백질 및 효소의 재합성, 에너지 대사 회복 등의 과정이 수반되어야 하기에 lag phase가 나타난다. (Pinto et al., 2011)

이번 실험에서는 우선 E.Coli를 LB배지에서 overnight로 사전 배양한 뒤 동일한 LB 조건에서 다시 배양하였다. 이는 비교적 비슷한 환경으로의 변화이기에 세포가 새로운 환경에 적응하기 위한 lag phase가 필요하지 않거나 기간이 매우 짧아 관찰되지 않았을 가능성이 크다. 또한 이

외에도 초기 세포수가 낮은 것도 이번 실험에서 lag phase가 없는 이유가 될 수 있다. 초기 세포수가 낮으면 O.D 값도 매우 작아, 작은 변화에도 크게 달라질 수 있다. lag phase가 있었지만 노이즈에 묻혀서 안보일 가능성이 있다는 것이다. 또한 만약 멸균이 완전하지 않아 외부 세균이 유입되었을 경우에는 초기 흡광도가 비정상적으로 높아져 lag phase가 가려질 수 있다.

log phase에서는 세대시간을 추정하기 위해  $N_a$ ,  $N_b$ ,  $N_c$  세쌍의 시점을 이용하였다.  $N_{a0}$ – $N_a$ (0.25–0.50 h)에 대해서는 7.70757에서 7.889302로 증가하여  $n = 0.60$ 세대,  $g = 0.41$ h/세대이고 이 두 점의 기울기는 약 0.73 / h이었다.  $N_{b0}$ – $N_b$ (1.25–1.50 h)에 대해서는 8.446382에서 8.587711으로 증가하여  $n = 0.47$ 세대,  $g = 0.53$ h/세대로, 기울기가 0.57 / h로 산출되었다. 이 두 쌍의 점은 동일한 시간 간격을 갖지만 기울기의 계산 값의 차이가 컸다. 이는 시간의 차이가 크지 않은 가까운 두 시점을 채택하였기에 logN에 존재하는 작은 측정 오차가 기울기에 과도하게 증폭되어 반영될 수 있기 때문이다.

반면  $N_{c0}$ – $N_c$ (0–1.75 h) 구간은  $\log N_0 = 7.550228$ ,  $\log N = 8.767156$ 에서  $n = 4.04$ 세대,  $t = 1.75$ h,  $g = 0.43$ h/세대로 산출하였다. 이 구간에서는  $\Delta t$ 는 1.75 h로 log phase의 전체를 포괄할 만큼 충분히 길기에 각 시점의 잡음이 평균화되면서 기울기 추정이 비교적 안정적으로 이루어진다. 따라서 시간 간격이 클수록 동일한 관측 오차가 기울기·세대시간 추정에 미치는 상대적 영향은 감소하며, 본 실험에서는  $N_c$  구간에서 계산된  $g$  값이 가장 덜 편향된 추정치로 해석할 수 있다. 이렇게 계산된 세대시간은 E. coli의 이론적 doubling time과 유사하지만 완전히 일치하지는 않는다. 그 차이는 측정 오차, OD의 비선형성, cuvette의 지문·기포·scratch 등으로 인한 산란 증가, blank의 오염 등 다양한 실험적 요인에 의해 발생할 수 있다.

이번 실험에서는 seeding을 50 $\mu$ L로 고정하여 시간 별 세포수 증가를 관찰했지만 seeding을 100 $\mu$ L로 증가시키더라도 stationary phase에서의 최대 세포수는 동일하게 나온다. 이는 실험에 사용한 집단이 streaking을 통해 얻은 단일 콜로니 기반의 유전적으로 비슷한 세포 집단이기 때문이다. 유전적으로 비슷한 집단은 동일한 LB 배지 환경에서 동일한 대사 속도와 자원 이용 특성을 보이므로, 배양 용기 부피, 산소 공급, 배지 내 영양분의 총량 등으로 결정되는 환경 수용력이 같다. 즉, 초기 접종량이 다르더라도 동일한 환경 조건에서는 개체군의 최종 크기가 환경수용력에 의해 제한되므로 최대 세포수는 일정한 값에 수렴하게 된다.

## VI. References

1. Monod, J. (1949). *The growth of bacterial cultures*. *Annual Review of Microbiology*, 3, 371–394.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>
2. Pinto, U. M., Pappas, K. M., & Winans, S. C. (2011). Lag phase is a distinctive, adaptive growth phase that prepares bacteria for exponential growth. *Journal of Bacteriology*, 193(3), 686–701.  
<https://doi.org/10.1128/JB.01222-10>
3. Stevenson, K., McVey, A. F., Clark, I. B. N., Swain, P. S., & Pilizota, T. (2016). General calibration of microbial growth in microplate readers. *Scientific Reports*, 6, 38828.  
<https://doi.org/10.1038/srep38828>